

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-191980

(43) 公開日 平成10年(1998) 7月28日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

C 1 2 N 15/09

9/16

// (C 1 2 N 9/16

C 1 2 R 1:15)

識別記号

Z N A

F I

C 1 2 N 15/00

9/16

Z N A A

Z

審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平9-1198

(22) 出願日 平成9年(1997) 1月8日

(71) 出願人 000206211

大成建設株式会社

東京都新宿区西新宿一丁目25番1号

(71) 出願人 000006091

明治製菓株式会社

東京都中央区京橋2丁目4番16号

(72) 発明者 斎藤 祐二

東京都新宿区西新宿一丁目25番1号 大成建設株式会社内

(72) 発明者 伊藤 雅子

東京都新宿区西新宿一丁目25番1号 大成建設株式会社内

(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリヒドロキシアルカノエイト分解酵素及びその製造方法

(57) 【要約】

【解決手段】 配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末端フラグメントを有し、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法で測定した分子量が約33,000である、ポリヒドロキシアルカノエイト分解酵素。コリネバクテリウム属に属し、前記酵素生産能を有する微生物を培地に培養し、得られる培養物から前記酵素を採取することを特徴とする、前記酵素の製造方法。前記酵素の遺伝子を含む組換えベクターによって形質転換された形質転換体を培地に培養し、得られる培養物から前記酵素を採取することを特徴とする、前記酵素の製造方法。

【効果】 ω-ヒドロキシアルカノエイト、特に4HBのホモポリエステル又はそれらを含む共重合ポリエステルの分解活性を有する新規なPHA分解酵素及びその効率的な製造方法を提供することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末端フラグメントを有し、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法で測定した分子量が約33,000である、ポリヒドロキシアルカノイト分解酵素。

【請求項2】 コリネバクテリウム属に属し、請求項1に記載のポリヒドロキシアルカノイト分解酵素生産能を有する微生物を培地に培養し、得られる培養物からポリヒドロキシアルカノイト分解酵素を採取することを特徴とする、前記ポリヒドロキシアルカノイト分解酵素の製造方法。

【請求項3】 請求項1に記載のポリヒドロキシアルカノイト分解酵素の遺伝子を含む組換えベクターによって形質転換された形質転換体を培地に培養し、得られる培養物からポリヒドロキシアルカノイト分解酵素を採取することを特徴とする、前記ポリヒドロキシアルカノイト分解酵素の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、新規ポリヒドロキシアルカノイト分解酵素及びその製造方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 微生物がエネルギー貯蔵物質として細胞内に蓄積するポリヒドロキシアルカノイト (PHA) は、生分解性を持つ熱可塑性ポリエステルであり、生分解性プラスチック素材として注目されている。最も代表的なPHAは、R体の3-ヒドロキシブチレート (3HB) のホモポリエステル、P([R]-3HB)であり、ポリプロピレンと同程度の強度を有するとともに優れた生分解性を兼ね備えている。しかしながら、極めて脆性な性質のために生分解性プラスチックとしては実用化されなかった。

【0003】 一方、近年では、用いる微生物や炭素源の種類に応じて、[R]-3HBと4-ヒドロキシブチレート (4HB) との共重合体などの共重合ポリエステルの生合成が確認されている。これらの共重合ポリエステルは構成するモノマーユニットの種類や共重合組成比に応じて結晶性のプラスチックから弾性に富むゴムまで幅広い物性を示すことから、生分解性プラスチックとして期待されている。

【0004】 PHAを分解する代表的な酵素としては、アルカリゲネス フェカリス (*Alcaligenes faecalis*)、コマモナス アシドボランス (*Comamonas acidovorans*)、シュードモナス ピケッティイ (*Pseudomonas pickettii*)、シュードモナス レモイグネイ (*Pseudomonas lemoignei*)、シュードモナス テストステロニ (*Pseudomonas testosteroni*)、ペニシリウム ピノフィラム (*Penicillium pinophilum*)などの微生物が細胞外に分泌するPHAデポリメラーゼが確認されている。これらの酵素の活性部位はセリン残基であり、ポリエステルの結晶化

度によってその分解活性が大きく影響されることが明らかとなっている。また、リゾプス デレマー (*Rizopus delemar*) などの真菌が生成するリパーゼもPHAの分解酵素として確認されており、ポリプロピラクトンやポリカプロラクトンなどの側鎖を持たないPHAを分解することが知られている。このように、現在まで確認されているPHAの分解酵素は、PHAデポリメラーゼとリパーゼのみである。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の課題は、新規なPHA分解酵素及び該酵素を効率よく生産する方法を提供することにある。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、上記課題を解決すべく、活性汚泥よりPHA分解酵素の探索を行った結果、コリネバクテリウム属に属する菌株IM-1株が菌体外に新規のPHA分解酵素を生産することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0007】 本発明は、配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末端フラグメントを有し、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法で測定した分子量が約33,000である、PHA分解酵素である。

【0008】 また、本発明は、コリネバクテリウム属に属し、上記PHA分解酵素生産能を有する微生物を培地に培養し、得られる培養物からPHA分解酵素を採取することを特徴とする、前記PHA分解酵素の製造方法である。

【0009】 さらに、本発明は、上記PHA分解酵素の遺伝子を含む組換えベクターによって形質転換された形質転換体を培地に培養し、得られる培養物からPHA分解酵素を採取することを特徴とする、前記PHA分解酵素の製造方法である。

## 【0010】

【発明の実施の形態】 以下、本発明を詳細に説明する。本発明のPHA分解酵素は、下記の理化学的性質を有する。

## 【0011】 1. 作用及び基質特異性

3-ヒドロキシプロピオネイト、4-ヒドロキシブチレート (4HB)、5-ヒドロキシバリライト、6-ヒドロキシカプロネイト等の $\omega$ -ヒドロキシアルカノイトのホモポリエステル又はそれらを含む共重合ポリエステルの分解する。その中でも、特に4HBのホモポリエステル又は4HBを含む共重合ポリエステルの分解活性が高い。

## 【0012】 本酵素の活性は以下のようにして調べた。

(1) アルカリゲネス ユウトロファス (*Alcaligenes eutrophus*) 又はコマモナスアシドボランスにより生合成された5種類の3HB-4HBランダム共重合体を用いて本発明の酵素の活性を調べた。各共重合体の数平均分子量及び4HBを表1に示す。

【0013】

【表1】

	数平均分子量	4HB分率
共重合体1	712,500	0モル%
共重合体2	83,800	14モル%
共重合体3	177,900	41モル%
共重合体4	140,700	69モル%
共重合体5	86,300	97モル%

【0014】共重合体1～5をそれぞれソルベントキャスト法にてフィルム化し、1cm角に切ったもの(約8mg)を試験片とした。各試験片をpH6.5のリン酸緩衝液6mlに入れ、酵素を1500 $\mu$ g添加した。37 $^{\circ}$ C、120rpmの条件で振盪しながら反応させた。経時的に反応液を採取して0.45 $\mu$ mのメンブランフィルターで濾過し、得られた濾過液中の水溶性有機化合物の炭素(水溶性炭素)を定量して、反応液1ml中の1時間当たりの水溶性炭素の溶出速度( $\mu$ g-C/ml/h)を求めた。

【0015】図1に3HB-4HBランダム共重合体中

	数平均分子量
ポリプロピラクトン (PPL)	25,000
ポリ-4-ヒドロキシブチレート (4HB)	99,000
ポリバレラクトン (PVL)	13,000
ポリカプロラクトン (PCL)	59,000

【0018】各重合体を、それぞれソルベントキャスト法にてフィルム化したものを試験片とした。各試験片について以下のようにして試験を行った。試験片9mgをpH6.5のリン酸緩衝液6mlに入れた。次に、酵素1500 $\mu$ gを添加した。37 $^{\circ}$ C、120rpmの条件で振盪しながら反応させた。経時的に反応液を採取して0.45 $\mu$ mのメンブランフィルターで濾過し、得られた濾過液中の水溶性炭素量を測定して、反応液1ml中の1時間当たりの水溶性炭素の溶出速度( $\mu$ g-C/ml/h)を求めた。

【0019】図2に各重合体についての水溶性炭素の溶出速度を示す。この結果から、本発明の酵素は、 $\omega$ -ヒドロキシアルカノエイト重合体の中でも、P(4HB)に対して高い分解活性を示すことがわかる。

【0020】2. N末端配列

純化したPHA分解酵素のN末端フラグメント22残基のアミノ酸配列をプロテインシーケンサー(PerkinElmer:Model 492)にて解析した。その結果、N末端フラグメントは、配列番号1で表されるアミノ酸配列を有していた。この配列と、各種既知酵素のN末端配列とのホモロジー検索を行ったところ、合致する酵素はなく、新規酵素であることが判明した。

【0021】3. 分子量

分子量をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法で測定したところ、約33,000であった。

【0022】4. 至適pH

本発明のPHA分解酵素の反応至適pHを酢酸緩衝液(pH4.0～5.5)、リン酸緩衝液(pH4.5～8.9)、トリス

の4HB分率と水溶性炭素の溶出速度の関係を示す。なお、既知の分解酵素であるアルカリゲネスフェカリス由来のPHAデポリメラーゼ、及びリゾプスデレマ由来のリパーゼによる分解活性を併せて示す。その結果、本発明のPHA分解酵素は、共重合体の4HB分率が0モル%の場合には分解活性を示さないが、4HB分率の増大に伴って指数関数的に分解活性が上昇するという特徴が見られた。なお、4HB分率97モル%の共重合体フィルムの分解生成物をHPLCで分析し、FAB-Mass及びLC-Massで同定したところ主な分解生成物は4HB-4HBのダイマー(分子量191)であることがわかった。

【0016】(2)炭素原子数3～6の直鎖の $\omega$ -ヒドロキシアルカノエイトの重合体についての本発明の酵素の活性を調べた。用いた重合体を表2に示す。

【0017】

【表2】

緩衝液(pH7.5～9.5)、グリシン緩衝液(pH9.0～10.5)を用いて測定した。なお、基質としては、4HB分率97モル%の3HB-4HB共重合体フィルムを用いた。各緩衝液にソルベントキャスト法で作製した1cm角の3HB-4HB共重合体フィルム(約6mg)を一枚入れ、酵素を250 $\mu$ g/mlの濃度で添加した後、30 $^{\circ}$ Cで穏やかに振盪しながら7時間反応させた。反応終了後に各フィルムを取り出し乾燥重量を秤量してフィルム分解量を求めた。図3に、pHとフィルム分解量の関係を示す。図3に示されるように、pH4～9の範囲で分解が確認され、最も分解量が多かった条件はpH6.5であった。この結果から、至適pHは5～8であった。

【0023】5. 至適温度

pH6.5のリン酸緩衝液1mlに酵素を250 $\mu$ g入れ、4HB分率97モル%の3HB-4HB共重合体フィルム(1cm角、約6mg)を1枚入れて、各種温度で穏やかに振盪しながら7時間反応を行った。反応終了後に各フィルムを取り出して乾燥重量を秤量してフィルム分解量を求めた。図4に温度とフィルム分解量の関係を示す。図4に示されるように20～60 $^{\circ}$ Cの範囲で分解が確認され、至適温度は37～42 $^{\circ}$ Cであった。

【0024】6. 安定温度

pH6.5のリン酸緩衝液6mlに酵素を1500 $\mu$ g入れ、各種温度で30分間穏やかに振盪処理した。その後、4HB分率97モル%の3HB-4HB共重合体フィルム(1cm角、約6mg)を1枚ずつ入れ、37 $^{\circ}$ Cで振盪培養を行った。経時的に各培養液を採取し、0.45 $\mu$ mのメンブラン

フィルターで濾過し、濾過液中の水溶性炭素量を測定して反応液1ml中の1時間当たりの水溶性炭素の溶出速度( $\mu\text{g-C/ml/h}$ )を求めた。処理前の溶出速度を100%活性とした場合の各種温度での処理後の活性を図5に示す。図5に示したとおり、42℃より高温になると活性が急激に低下した。したがって本酵素は42℃まで安定である。

#### 【0025】7. 等電点

等電点をアクリルアミドゲル焦点電気泳動法で測定したところ、約8.6であった。

#### 【0026】8. 各種物質の影響

酵素1500 $\mu\text{g}$ を配合したpH6.5のリン酸緩衝液6mlに、阻害物質としてフェニルメチルスルフォニルフルオリド(PMSF)、ジチオトレイトール(DTT)、ジイソプロピルフルオロリン酸(DFP)を各々所定濃度配合した。さらに、4HB分率97モル%の共重合フィルム(1cm角、約6mg)を各濃度の阻害物質を含む酵素液に一枚入れ、37℃で穏やかに振盪培養した。経時的に培養液を採取し、0.45 $\mu\text{m}$ のメンブレンフィルターで濾過し、水溶性炭素量を測定した。反応液1ml中の1時間当たりの水溶性炭素の溶出速度を100%として各濃度での活性を求めた。表3に、50%活性となる各阻害物質の濃度を示す。特に、DFPでは0.15 $\mu\text{M}$ で活性が50%となり、顕著な阻害効果があった。

#### 【0027】

##### 【表3】

阻害剤	50%活性阻害濃度
PMSF	1.92mM
DTT	73mM
DFP	0.15 $\mu\text{M}$

【0028】本発明のPHA分解酵素の製造において使用する微生物は、コリネバクテリウム属に属し、該PHA分解酵素生産能を有する菌株であればいずれのものでもよく、微生物を用いて製造することができる。その具体例としては、コリネバクテリウム アクアティカム(*Corynebacterium aquaticum*) IM-1株を挙げることができる。また、このIM-1株は、他の細菌と同様にその性状が変化しやすく、例えば、紫外線、X線、薬品などを用いる人工的変異手段で変異しうるものであり、このような変異株や変種も同様の活性を有する限り用いることができる。IM-1株の菌学的性質は下記のとおりである。

#### 【0029】1. 形態的性質

CGY培地(カシトン5g/L、グリセロール5g/L、酵母エキス1g/L)で生育したIM-1株の栄養細胞は、0.5~0.7 $\times$ 1.5~3.0ミクロンの桿菌である。また、30℃、2日の培養で孢子を形成せず、球状に細胞形態が変化する多形性を示すグラム陽性桿菌であった。

#### 【0030】2. 培養的性質

IM-1株は、通常の細菌用培地に25~40℃、1~3日の培養で増殖する。

#### 【0031】3. 生理学的性質

- (1) 酸素に対する態度：好気性
- (2) acid-fast：陰性
- (3) 抗酸性：陰性
- (4) rod-coccus cycle：陽性
- (5) 集落の色調：黄色系
- (6) 硝酸塩の還元：陰性
- (7) オキシダーゼ：陰性
- (8) ガラクターゼ：陽性
- (9)  $\beta$ -グルクロニダーゼ：陰性
- (10)  $\beta$ -グルコシダーゼ：陽性
- (11) N-アセチル- $\beta$ -グルコシダーゼ：陽性
- (12) ウレアーゼ：陰性
- (13) デンプンの加水分解：陽性
- (14) グルコースからの発酵：陰性
- (15) 糖の利用性：リボース、キシロース、マンニトール、マルトース、ラクトース、シュクロース、グリコーゲンからの生育はなし

【0032】以上の菌学的性質を有するIM-1株をA.P.Iコリネシリーズによる同定及びBergey's Manual of Determinative Bacteriologyに記載された既知菌種と比較した結果、IM-1株はコリネバクテリウム アクアティカムであることが判明した。尚、コリネバクテリウム アクアティカムIM-1株は、工業技術院生命工学工業技術研究所に平成8年11月13日付けで寄託し、受託番号FERM P-15949を得ている。

【0033】コリネバクテリウム属に属する微生物を用いてPHA分解酵素を生産させるには、CGY培地又はニュートリエントブロス等の天然培地で好氣的に培養することによって細胞を増やし、次に回収した細胞をPHA分解酵素の誘導培地に移し、さらに好氣的に培養する方法により行われる。

【0034】PHA分解酵素の誘導に使用される培地としては、唯一の炭素源として酢酸、プロピオン酸、酪酸、フマル酸、ブタノール、メタノール、トリオレイン、パラフィン、4-ヒドロキシ酪酸又はポリ-4-ヒドロキシ酪酸を含み、窒素源として塩化アンモニウム又は硫酸アンモニウムを含み、さらに硫酸マグネシウムを配合したものが例示される。

【0035】培養は、通気攪拌などにより好氣的に行う。培養温度は、通常25~37℃、好ましくは27~32℃である。また、誘導培地による培養開始時のpHは通常6.0~8.0、好ましくは7.0程度である。培養時間は、通常20~96時間、好ましくは40~96時間である。

【0036】培養物からのPHA分解酵素の分離・精製は、培養物を遠心分離にかけて菌体を除去し、得られた上澄液を、カラムクロマトグラフィー、硫酸アンモニウ

ムによる分画沈澱、ゲル濾過などの、従来から通常用いられている酵素精製方法で精製することにより行うことができる。このようにして純化されたPHA分解酵素が得られる。

【0037】また、本発明のPHA分解酵素は、該酵素の遺伝子を含む組換えベクターによって形質転換された形質転換体を培地に培養し、得られる培養物から該酵素を採取することによっても製造することができる。本発明のPHA分解酵素の遺伝子は、例えば、コリネバクテリウム アクアティカムIM-1株から分離することができ、該遺伝子を含む組換えベクターによって形質転換された形質転換体は以下のようにして得られる。まず、PHA分解酵素のN末端のアミノ酸配列、即ち配列番号1のアミノ酸配列に基づいて、その全配列又は部分配列をコードする塩基配列を有するDNAプローブを化学合成する。一方、コリネバクテリウム アクアティカムIM-1株をCGY培地又はニュートリエントブロス等の天然培地で好気的に培養して菌体を集め、常法により染色体DNAを抽出精製する。精製染色体DNAを適当な制限酵素により切断してDNA断片混合物を得る。上記合成DNAプローブを用いたサザンハイブリダイゼーション法により、このDNA断片混合物からDNAプローブとハイブリッド形成するDNA断片を取得する。同じ接着末端を生じさせる制限酵素で処理したクローニングベクターに、取得されたDNA断片を挿入ないし連結する。クローニングベクターは、通常のクローニングに用いるプラスミドベクター、ファージベクターのいずれでもよい。このようにして得られた組換えベクターを用いて宿主の形質転換を行い、コロニーハイブリダイゼーション法により目的とする形質転換体を得ることができる。宿主としては、例えば、大腸菌等を用いることができる。

【0038】

【実施例】以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例の範囲に限定されるものではない。

【0039】〔実施例1〕3Lのジャーフェーマンター3基に、各々4-ヒドロキシ酪酸ナトリウム5g/l、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  1g/l、および  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g/l を含む誘導培地2Lを入れ、121℃で15分間滅菌した。これに、CGY液体培地100mlを含む500ml三角フラスコで種培養したコリネバクテリウム アクアティカムIM-1株を各々のジャーに無菌的に植菌し、30℃で24時間通気攪拌培養

配列

Ala Gly Pro Val Thr Leu Glu Ala Thr Phe Thr Ser Ser Cys Cys Gly

1

5

10

15

Trp Glu Lys Val Glu Arg

20

【図面の簡単な説明】

【図1】3HB-4HBランダム共重合体中の4HB分

を行った。尚、pHは1N- $\text{H}_2\text{SO}_4$  で常時7.0に調節した。

【0040】培養終了後、6000rpmで30分間遠心分離を行い培養上澄液を得た。次に、分画分子量30,000の限外濾過膜（ダイセル：FB02-CC-FUY03A1）で処理し、分子量30,000以上の分画を回収した。回収した分子量30,000以上の分画はエバポレーターで35mlまで濃縮を行い粗酵素液とした。セファデックスG-50を450ml充填したカラム（長さ900mm、径30mm）に粗酵素液を添加し蒸留水で展開した。溶離液は10mlづつのフラクションとして採取し、各フラクションの0.1mlを4HB分率97モル%の3HB-4HB共重合体粉末を懸濁させたPHA寒天プレートに滴下し、スポット周辺に形成されたクリアゾーンの直径で酵素活性を判断した。

【0041】PHA分解活性の確認されたフラクションを集め濃縮後凍結乾燥して360mgの粗酵素粉末を得た。次に蒸留水15mlに粗酵素粉末360mgを溶解し、トヨパールHW40（Fine）450mlを充填した（長さ900mm、径30mm）カラムに添加し蒸留水にて展開した。PHA分解活性を示したフラクションを集め最終的に230mgの酵素を得た。尚、各フラクションをSDS-PAGE電気泳動にかけたところ全て単一バンドであった。図6にSDS-PAGE電気泳動写真を示す。図6において、一番左側のバンドは分子量マーカであり、左から2番目のバンドはセファデックスG-50カラム処理後のPHA分解活性の確認されたフラクションのものであり、左から3番目以降はトヨパールHW40カラム処理後のPHA分解活性を示したフラクションのものである。

【0042】

【発明の効果】本発明により、 $\omega$ -ヒドロキシアルカノエイト、特に4HBのホモポリエステル又はそれらを含む共重合ポリエステルの分解活性を有する新規なPHA分解酵素及びその効率的な製造方法を提供することができる。

【0043】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：22

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：N末端フラグメント

率と本発明の酵素による水溶性炭素の溶出速度の関係を示すグラフである。

【図2】各種 $\omega$ -ヒドロキシアルカノエイト重合体の本発明の酵素による水溶性炭素の溶出速度を示すグラフである。

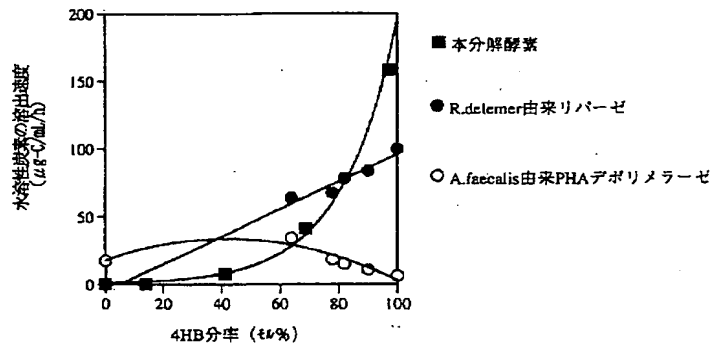
【図3】本発明の酵素の至適pHを示すグラフである。

【図4】本発明の酵素の至適温度を示すグラフである。

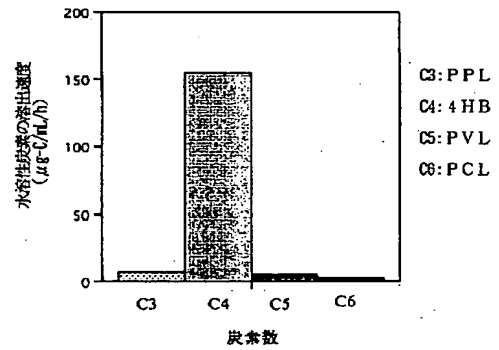
【図5】本発明の酵素の安定温度を示すグラフである。

【図6】本発明の酵素のSDS-PAGE電気泳動写真である。

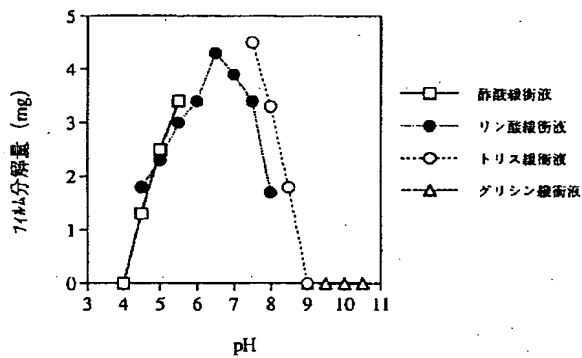
【図1】



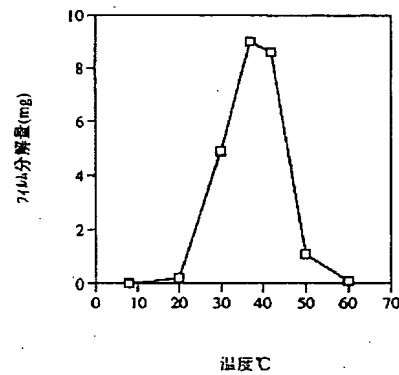
【図2】



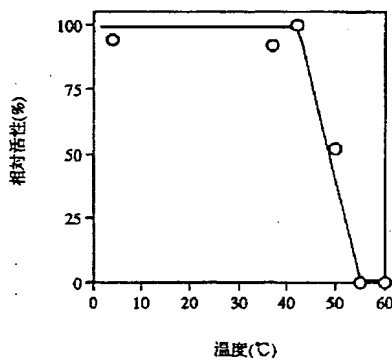
【図3】



【図4】



【図5】



【図6】



【手続補正書】

【提出日】平成9年1月10日

【手続補正1】

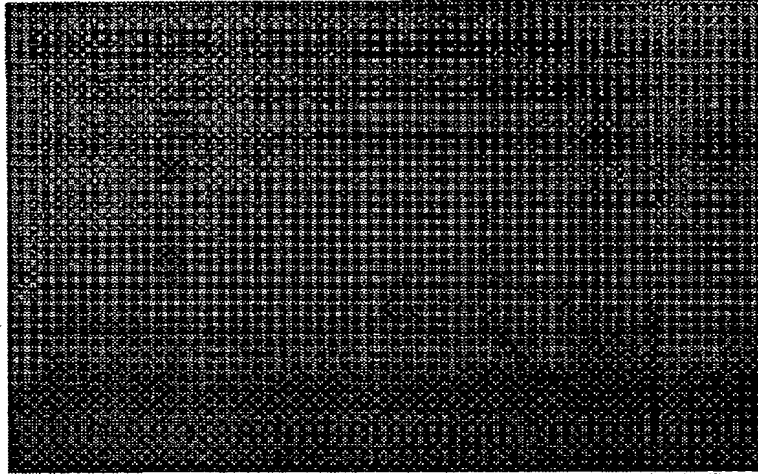
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図6

【補正方法】変更

【補正内容】

【図6】



図面代用写真

---

フロントページの続き

(72)発明者 武部 英日

神奈川県小田原市栢山788 明治製菓株式  
会社薬品技術研究所内

(72)発明者 松信 俊男

神奈川県小田原市栢山788 明治製菓株式  
会社薬品技術研究所内